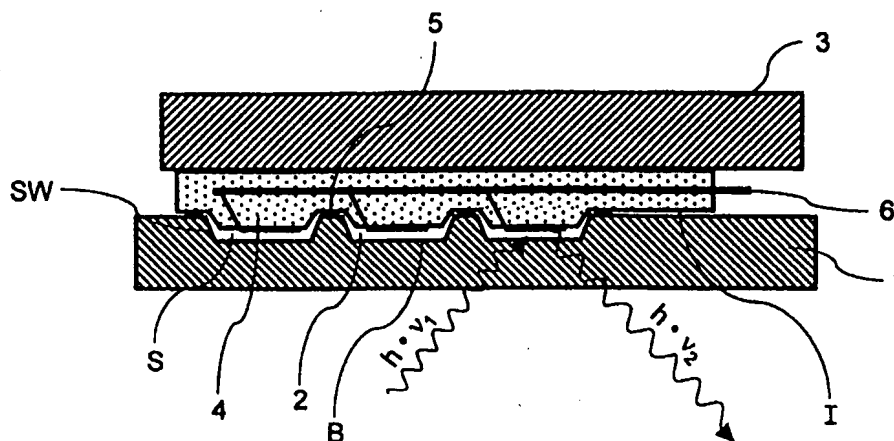




<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : B01L 3/00, 7/00 // C12Q 1/68</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64157</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Dezember 1999 (16.12.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01589</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Mai 1999 (29.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 26 153.5 12. Juni 1998 (12.06.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): NOVEMBER AG NOVUS MEDICULATUS BERTLING GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, D-91056 Erlangen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49a, D-91052 Erlangen (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT; BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR PREPARING SAMPLES FOR DETECTING A NUCLEOTIDE SEQUENCE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR PROBENVORBEREITUNG FÜR DEN NACHWEIS EINER NUKLEOTIDSEQUENZ



(57) Abstract

The invention relates to a method for preparing samples for detecting a nucleotide sequence by polymerase chain reaction (PCR), according to which a) an analysis solution is filled into at least one cavity (2) provided for in a support (1); b) a lid (3) configured complementary to the shape of the cavity (2) is placed onto the support (1) in such a way that the analysis solution is pushed at least partly into a gap (S) formed between the cavity (2) and the lid (3); and c) the gap (S) is sealed by means of at least one seal (5, 12) provided for near an opening in the cavity (2).

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Probenvorbereitung für den Nachweis einer Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), wobei (a) eine Nachweislösung in mindestens eine an einem Träger (1) vorgesehene Kavität (2) gefüllt wird, (b) ein zur Form der Kavität (2) komplementär ausgebildeter Deckel (3) so auf den Träger (1) gesetzt wird, daß die Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität (2) und dem Deckel (3) gebildeten Spalt (S) verdrängt wird und (c) der Spalt (S) durch mindestens eine in der Nähe einer Öffnung der Kavität (2) vorgesehene Dichtung (5, 12) abgedichtet wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren und Vorrichtung zur Probenvorbereitung für den Nachweis einer Nukleotidsequenz

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Probenvorbereitung für den Nachweis einer Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Sie betrifft ferner eine Vorrichtung nach dem Oberbegriff des Anspruchs 14.

10 Aus der US 5,455,175 ist ein sogenannter Thermocycler bekannt, mit dem eine Mehrzahl an flüssigen biologischen Proben zur Durchführung der PCR wiederkehrend einem vorgegebenen Temperaturprofil ausgesetzt werden kann. Um die erforderliche Zeit für die Temperaturbehandlung zu verkürzen, ist hier je-
15 weils ein kleines Volumen der biologischen Proben in einer dünnwandigen Glaskapillare aufgenommen. Dazu muß jede Probe einzeln in die Kapillare abgefüllt und anschließend eingeschweißt werden. Das ist zeitaufwendig.

20 Aus der DE 33 36 738 A1 ist eine Titerplatte nach dem Oberbegriff des Anspruchs 14 bekannt. Der Deckel der bekannten Titerplatte läßt sich nur mit erheblichem Kraftaufwand vom Träger entfernen. Eine in der bekannten Vorrichtung aufgenommene Probe ist schwer von außen zu beheizen; die Vorrichtung ist
25 zur Durchführung der PCR ungeeignet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Insbesondere sollen ein Verfahren und eine Vorrichtung angegeben werden, mit denen
30 bei der PCR der Zeitaufwand zur Probenvorbereitung verringert wird. Weiters Ziel der Erfindung ist eine vereinfachte und verbesserte, insbesondere in Echtzeit erfolgende, Detektion sowie eine Steigerung der Sensitivität.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 14 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 13 und 15 bis 43.

5

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Probenvorbereitung für den Nachweis einer Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion vorgesehen, wobei

- 10 a) eine Nachweislösung in mindestens eine an einem Träger vorgesehene Kavität gefüllt wird,
- b) ein zur Form der Kavität komplementär ausgebildeter Deckel so auf den Träger gesetzt wird, daß die Nachweislösung
15 zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität und dem Deckel gebildeten Spalt verdrängt wird und
- c) der Spalt durch mindestens eine in der Nähe einer Öffnung der Kavität vorgesehene Dichtung abgedichtet wird.

20

Mit dem vorgeschlagenen Verfahren wird die Zeit zur Probenvorbereitung erheblich verkürzt. Der Vorgang des Einschweißens der Probenlösung in eine Kapillare entfällt.

- 25 Der Nachweislösung kann ein erster und/oder zweiter Primer zugesetzt sein. Es wird als besonders vorteilhaft angesehen, daß ein dritter Primer, vorzugsweise mit seinen 5'-terminalen Ende, an die in die Kavität ragende Innenseite des Deckels gebunden ist. Auf diese Weise ist es möglich, eine ggf. in
30 einer Probe enthaltene Nukleotidsequenz an den dritten Primer anzulagern. Das kann besonders einfach durch Eintauchen der Innenseite des Deckels in die Probe erreicht werden. Ferner kann die amplifizierte Nukleinsäure nach Abschluß der Ampli-

fikationszyklen durch Binden an den dritten Primer an der Innenseite angereichert werden. Die Anreicherung wird zweckmäßigerweise durch Anlegen eines elektrischen Felds durchgeführt. Unter dem Einfluß eines elektrischen Felds wird die
5 Nukleotidsequenz in Richtung des dritten Primers bewegt.

Zum Nachweis des Vorliegens der gesuchten Nukleotidsequenz wird zweckmäßigerweise die Nachweislösung und/oder einer der Primer auf deren Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Bei Anlagerung der nachzuweisenden Nukleotidsequenz an einen der
10 Primer kann eine Veränderung der fluorogenen Eigenschaften der in der Nachweislösung befindlichen Stoffe erfolgen. Vorteilhafterweise ist bei Anlagerung der nachzuweisenden Nukleotidsequenz an einen der Primer eine räumliche Beziehung
15 zwischen zwei fluorophoren Gruppen so änderbar, daß eine Fluoreszenzreaktion erzeugt-, änder- oder aufhebbar ist.

Nach einer weiteren Ausgestaltung wird die Nachweislösung zyklisch aufgeheizt und abgekühlt. Ein typischer Temperaturzyklus besteht aus einem ersten Aufheizen der Nachweislösung
20 auf 90 bis 92°C, einem Abkühlen auf 50 bis 55°C sowie einem zweiten Aufheizen auf 72 bis 75°C. Während des ersten Aufheizens erfolgt eine Denaturierung, während des Abkühlens die Renaturierung und während des zweiten Aufheizens die Synthese
25 der Nukleotidsequenz. Der vorgenannte Zyklus wird etwa 30 mal wiederholt.

Das Aufheizen kann mittels Licht, vorzugsweise Infrarotstrahlung, einer Widerstandsheizung oder durch Umspülen der Kavität mit einem Gas oder einer Flüssigkeit durchgeführt werden.
30 Ein schnelles Abkühlen wird zweckmäßigerweise durch Umspülen der Kavität mit einem Gas, z.B. Luft, oder einer Flüssigkeit oder mittels eines Peltierelements durchgeführt.

Erfindungsgemäß ist ferner eine Vorrichtung zum Nachweis einer in einer Probe ggf. enthaltenen Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion vorgesehen, bei der die Kavität
5 eine konisch zur Öffnung sich erweiternde umlaufende Seitenwand und der Spalt eine Breite von höchstens 1mm aufweist.

Die vorgeschlagene Vorrichtung erlaubt eine zeitsparende Probenvorbereitung. Mit ihr kann der Zeitaufwand zur Durchführung einer PCR erheblich vermindert werden. Der Deckel kann
10 nach der Durchführung der PCR ohne großen Kraftaufwand abgehoben werden.

Vorteilhafterweise ist eine Einrichtung zum zyklischen Aufheizen und Abkühlen der Nachweislösung vorgesehen. Ferner kann eine Einrichtung zum Untersuchen der Fluoreszenzeigenschaften der Nachweislösung und/oder einer der Primer vorgesehen sein.
15

Der Träger kann aus einem lichtdurchlässigen Material, vorzugsweise aus Glas oder Kunststoff, hergestellt sein. Die Kavität ist zweckmäßigerweise abschnittsweise planar ausgebildet; sie weist vorzugsweise einen ebenen Boden auf. Auf dem Träger und/oder an der Innenseite des Deckels kann an zwischen den Kavitäten bzw. an der Innenseite des Deckels angeordneten Vorsprüngen befindlichen Abschnitten eine weitere Dichtung vorgesehen sein. Die weitere Dichtung kann ebenso wie die Dichtung z.B. aus Gummi, Silikon, Teflon oder anderen geeigneten Materialien hergestellt sein.
20
25

30

Es wird als besonders vorteilhaft angesehen, daß der Träger 96 Kavitäten und der Deckel 96 zur Form der Kavitäten komplementäre Vorsprünge aufweist. So kann der Träger beispielsweise

se in etwa die Dimension einer herkömmlichen 96-Napf Mikrotiterplatte aufweisen. Selbstverständlich kann der Träger auch Bruchteile, oder ein Vielfaches der vorgenannten Kavitätenanzahl aufweisen.

5

Nach einer weiteren Ausgestaltung kann der Deckel aus einem elektrisch leitfähigen Material, vorzugsweise aus einem Kunststoff, hergestellt sein. Der Träger kann eine, vorzugsweise aus Platin hergestellte, Elektrode aufweisen, so daß
10 zwischen dem Deckel und dem Träger ein elektrisches Feld angelegt werden kann, durch das in der Nachweislösung enthaltene Nukleotidsequenz auf die Innenseite bewegt und durch Felddinversionzyklen angereichert werden können.

15 Der Kunststoff kann ein Polycarbonat, ein Trimenthylthiophen, Triaminobenzol und/oder ein Polycarben enthalten und die Innenseite des Deckels kann zumindest abschnittsweise mit einer biomolekülbindenden Substanz versehen sein. Dabei kann die Bindung der Nukleotidsequenz zum Kunststoff durch Streptavidin oder Avidin vermittelt werden.
20

Der Nachweislösung ist vorteilhafterweise ein erster und/oder zweiter Primer zugesetzt. Als besonders vorteilhaft wird angesehen, daß an der der Kavität zugewandten Innenseite des
25 Deckels ein dritter Primer, vorzugsweise mit einem 5'-terminalen Ende, gebunden ist. Das ermöglicht eine Entfernung der amplifizierten Nukleotidsequenz aus der Nachweislösung.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist ein zum Anregen
30 von Fluoreszenz zwischen dem Boden und der Innenseite des Deckels dienendes Mittel vorgesehen. Vom Mittel zum Anregen stammende Strahlung kann auf die Innenseite des Deckels fokussierbar sein. Das ist insbesondere dann von Vorteil, wenn

die Nukleotidsequenz über den dritten Primer an die Innenseite gebunden ist. Das Mittel zum Anregen von Fluoreszenz wird zweckmäßigerweise von einer Laserdiode erzeugt. Es handelt sich in diesem Fall also um Laserlicht. Eine Anregung der Böden des Trägers kann auch durch einen sogenannten "gally-mode" Laser (Science 1998, 280, p 1501, 1544 ff.) in einer vorgegebenen Weise gleichzeitig oder sukzessive erreicht werden.

Ferner können eine Einrichtung zur Detektion der Fluoreszenz, eine Einrichtung zur Auswertung der beobachteten Fluoreszenz und eine Einrichtung zum Bewegen des Trägers relativ zum Mittel zum Anregen der Fluoreszenz und/oder zur Einrichtung zur Detektion vorgesehen sein. Außerdem kann ein facettenaugenartiges Mittel zu separaten Anregung und/oder Detektion der Fluoreszenz zwischen jedem Boden und der Innenseite des dazugehörigen Deckels vorgesehen sein. Dadurch wird weitere Analysenzeit eingespart.

Der Deckel und/oder der Träger sind zweckmäßigerweise zumindest abschnittsweise schwarz gefärbt, so daß darauf abgestrahlte Wärme wirkungsvoll absorbiert wird. Sie bestehen insbesondere aus einem hoch wärmeleitfähigen Material.

Ferner kann eine Einrichtung zum zyklischen Aufheizen und Abkühlen der Nachweislösung vorgesehen sein, wobei zum Beheizen vorteilhafterweise ein Mittel zur Erzeugung von Licht, vorzugsweise Infrarotstrahlung, eine Widerstandsheizung oder ein Mittel zum Umspülen der Kavität mit einem Gas oder einer Flüssigkeit vorgesehen ist. Ferner ist zweckmäßigerweise ein Mittel zum Abkühlen vorgesehen, wobei die Abkühlung vorzugsweise durch Umspülen der Kavität mit einem Gas oder einer Flüssigkeit oder mittels eines Peltierelements erzielt wird.

Zur Verbesserung der Wärmeleitfähigkeit bei gleichzeitig guter Transparenz kann der Träger einen aus einem Glas hergestellten Boden aufweisen. Die Dichtung ist zweckmäßigerweise durch eine an der, vorzugsweise aus Kunststoff hergestellten, 5 Seitenwand umlaufende Ausnehmung und einen dazu komplementären am Vorsprung vorgesehenen umlaufenden formschlüssig in die Ausnehmung einrastbaren Wulst gebildet. Die Dichtung ist zweckmäßigerweise bei einem Druckanstieg in der Kavität, z.B. durch Temperaturerhöhung, selbstabdichtend, indem der Wulst 10 gegen die Ausnehmung gedrückt wird. Das Aufbringen oder Abheben des Deckels läßt sich durch eine hohe Flexibilität der zwischen den Vorsprüngen liegenden Abschnitte durch leichtes Biegen besonders einfach bewerkstelligen.

15 Schließlich wird ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens beansprucht, mit

- a) einem Träger mit mindestens einer Kavität und
- 20 b) einem zur Kavität komplementär ausgebildeten Deckel, der so auf den Träger aufsetzbar ist, daß eine in der Kavität aufgenommene Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität und dem Deckel gebildeten Spalt verdrängbar ist und
- 25 c) eine mindestens einen ersten Primer enthaltenden Nachweislösung.

Die Nachweislösung kann einen zweiten Primer enthalten. Ein 30 dritter Primer kann, vorzugsweise mit seinem 5'-terminalen Ende, an eine der Kavität zugewandte Innenseite des Deckels gebunden sein.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung näher erläutert. Es zeigen:

5 Fig. 1 eine schematische Querschnittsansicht durch eine erste Vorrichtung,

 Fig. 2 die Vorrichtung gemäß Fig. 1 bei Anregung und Detektion,

10 Fig. 3 eine schematische Querschnittsansicht einer zweiten Vorrichtung bei Anregung und Detektion,

 Fig. 3a eine schematische Querschnittsansicht der Vorrichtung gemäß Fig. 3,
15

 Fig. 4 eine schematische Teilquerschnittsansicht einer dritten Vorrichtung,

 Fig. 5 eine schematische Querschnittsansicht einer Dichtung und
20

 Fig. 6 die Querschnittsansicht nach Fig. 5 im nicht eingerasteten Zustand.

25 In Fig. 1 weist ein Träger 1 mehrere Kavitäten 2 auf. Ein Deckel 3 ist an seiner Innenseite I mit mehreren Vorsprüngen 4 versehen. Die Vorsprünge 4 weisen eine zur Kavität 2 komplementäre Form auf. Zwischen einem Boden B der Kavität 2 und dem parallel verlaufenden gegenüberliegenden Vorsprung 4 ist
30 ein Spalt S gebildet. Die Kavität 2 ist des weiteren durch eine sich vom Boden B zur Öffnung der Kavität 2 hin konisch öffnende umlaufende Seitenwand SW begrenzt. Der zwischen dem Vorsprung 4 und der Kavität 2 gebildete Spalt S weist eine

Breite von höchstens 1 mm auf. In der Nähe der Öffnung der Kavität 2 ist eine Dichtung 5 vorgesehen. Mit 6 ist eine im Deckel 3 eingegossene Elektrode bezeichnet. Der Träger 1 kann eine (hier nicht dargestellte) Gegenelektrode aufweisen.

5

In Fig. 2 ist die Vorrichtung nach Fig. 1 bei der Anregung und Detektion gezeigt. Mit 7 ist schematisch eine optische Einrichtung zum Anregen der im Spalt S aufgenommenen Nachweislösung bezeichnet. Dabei handelt es sich um ein facetten-
10 augenartiges Mittel, mit dem mehrere oder alle Kavitäten 2 gleichzeitig z.B. mit Laserlicht beaufschlagt werden können. Die optische Einrichtung 7 ist auf die dem Boden B gegenüberliegende Innenseite I des Deckels 3 fokussiert. Mit 8 ist ein Fluorometer bezeichnet. Auch das Fluorometer 8 kann mit einem
15 facettenaugenartigen Mittel versehen sein, so daß die von mehreren oder allen Kavitäten 2 ausgehende Fluoreszenz nachweisbar ist. Gegenüber dem Träger 1 befinden sich eine Infrarotstrahlungsquelle 9 sowie ein Ventilator 10.

20 Die Fig. 3 und 3a zeigen eine zweite Vorrichtung im schematischen Querschnitt. Dabei ist die Infrarotstrahlungsquelle 9 gegenüber dem Deckel 3 angeordnet. Der Deckel 3 ist aus einem schwarzen Material hoher Wärmeleitfähigkeit, z.B. einem Glas oder Metall, hergestellt. Zur besseren Absorption ist der
25 Deckel 3 auf der der Innenseite I gegenüberliegenden Außenseite A mit einer schwarzen Farbe beschichtet. Die erste Dichtung 5 ist als selbstabdichtende Rastverbindung ausgebildet. Eine zweite Dichtung 12 in der Nähe des Öffnungsrandes der Kavität 2 besteht aus Gummi oder elastischem Kunststoff.
30 Sie ist zwischen der Innenseite I des Deckels 3 und einer Oberseite O des Trägers 1 vorgesehen. Eine in der Kavität 2 aufgenommene Nachweislösung ist bei geschlossenem Deckel 3 in einen zwischen der Seitenwand SW und einer gegenüberliegenden-

den Mantelfläche MF des Vorsprungs 4 befindlichen Spaltabschnitt SA verdrängt.

Auch in Fig. 4 ist der Träger 1 komplementär zum Deckel 3 geformt. Er ist ebenfalls aus einem Material hoher Wärmeleitfähigkeit hergestellt. Der Boden B ist aus einem transparenten Material, z.B. einem Glasfenster 11, gebildet.

In Fig. 5 ist in einer schematischen Teilquerschnittsansicht durch die erste Dichtung 5 gezeigt. Dabei greift ein an der Mantelfläche MF des Vorsprungs 4 vorgesehener umlaufender Wulst 13 im geschlossenen Zustand form- und kraftschlüssig in eine an der Seitenwand SW vorgesehene umlaufende Ausnehmung 14 ein. Fig. 6 zeigt die erste Dichtung 5 im noch nicht form-schlüssig eingerasteten Zustand.

Die Funktion der Vorrichtung ist folgende:

Zur Probenvorbereitung wird Nachweislösung in die Kavität 2 des Trägers 1 pipettiert. Der Pipettiervorgang kann beispielsweise mittels eines Pipettierroboters erfolgen. Bei der Nachweislösung handelt es sich vorzugsweise um einen sogenannten Mastermix, in dem alle erforderlichen Reagenzien zur Durchführung der PCR enthalten sind. Insbesondere sind ein erster und ein zweiter Primer in der Nachweislösung enthalten. An der Innenseite I des Deckels 3 ist im Bereich der Vorsprünge 4 ein dritter Primer gebunden. An den dritten Primer ist die nachzuweisende Nukleotidsequenz angelagert. Die Anlagerung kann z.B. dadurch erfolgen, daß der Deckel 3 zuvor in eine die nachzuweisende Nukleotidsequenz enthaltende Probenlösung getaucht wird.

Zur Probenvorbereitung muß nun der Deckel 3 lediglich auf den Träger 1 so aufgesetzt werden, daß die Vorsprünge 4 in die komplementären Kavitäten 2 eintauchen. Dabei kommt der dritte Primer mit der angelagerten Nukleotidsequenz in Kontakt mit der Nachweislösung. Der Deckel 3 wird mit dem Träger 1 dichtend verschlossen, z.B. indem die an den Vorsprüngen 4 vorgesehenen Wülste 13 in die komplementären Ausnehmungen 14 der Kavitäten 2 einrasten. In diesem Zustand wird ein Teil der Nachweislösung in den Spalt S verdrängt.

10

Anschließend wird insbesondere der zwischen der Innenseite I und dem Boden B gebildeter Spalt S der zur Durchführung der PCR erforderlichen Temperaturbehandlung unterzogen. Danach oder auch zwischen jedem Temperaturzyklus wird der zwischen Innenseite I und Boden B befindliche Bereich jeder Kavität 2 mittels der optischen Einrichtung 7 angeregt und dann unter Verwendung des Fluorometers 8 auf Fluoreszenz untersucht. Eine Fluoreszenzänderung zeigt das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein der gesuchten Nukleotidsequenz an.

20

Die Temperaturzyklen werden durch wiederkehrendes Aktivieren bzw. Deaktivieren der IR-Strahlungsquelle 9 bzw. des Ventilators 10 hervorgerufen.

Bezugszeichenliste

	1	Träger
	2	Kavität
5	3	Deckel
	4	Vorsprung
	5	erste Dichtung
	6	Elektrode
	7	optische Einrichtung
10	8	Fluorometer
	9	IR-Strahlungsquelle
	10	Ventilator
	11	Glasfenster
	12	zweite Dichtung
15	13	Wulst
	14	Ausnehmung
	I	Innenseite
	B	Boden
20	SW	Seitenwand
	S	Spalt
	A	Außenseite
	O	Oberseite
	MF	Mantelfläche
25	SA	Spaltabschnitt

Patentansprüche

1. Verfahren zur Probenvorbereitung für den Nachweis einer Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), bei der die Probe mit der Nachweislösung in Kontakt gebracht wird, wobei
 - a) eine Nachweislösung in mindestens eine an einem Träger (1) vorgesehene Kavität (2) gefüllt wird,
 - b) ein zur Form der Kavität (2) komplementär ausgebildeter Deckel (3) so auf den Träger (1) gesetzt wird, daß die Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität (2) und dem Deckel (3) gebildeten Spalt (S) verdrängt wird und
 - c) der Spalt (S) durch mindestens eine in der Nähe einer Öffnung der Kavität (2) vorgesehene Dichtung (5, 12) abgedichtet wird.
2. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Nachweislösung ein erster Primer zugesetzt wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Nachweislösung ein zweiter Primer zugesetzt wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein dritter Primer, vorzugsweise mit seinem 5'-terminalen Ende, an die in die Kavität (2) ragenden Innenseite (I) des Deckels (3) gebunden ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in der Probe ggf. enthaltene Nukleotidsequenz an den dritten Primer angelagert ist.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5, wobei amplifizierte Nukleinsäure nach Abschluß der Amplifikationszyklen durch Binden an den dritten Primer an der Innenseite (I) angereichert wird.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Anreicherung durch Anlegen eines elektrischen Felds durchgeführt wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nachweislösung und/oder einer der Primer auf deren
15 Fluoreszenzeigenschaften untersucht wird/werden.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Anlagerung der nachzuweisenden Nukleotidsequenz an einen der Primer eine Veränderung der fluorogenen Eigenschaften der in der Nachweislösung befindlichen Stoffe
20 erfolgt.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Anlagerung der nachzuweisenden Nukleotidsequenz an
25 einen der Primer eine räumliche Beziehung zwischen zwei fluorophoren Gruppen so geändert wird, daß eine Fluoreszenzreaktion erzeug-, änder- oder aufhebbar ist.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
30 die Nachweislösung zyklisch aufgeheizt und abgekühlt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Aufheizen mittels Licht, vorzugsweise Infrarotstrahlung, einer Widerstandsheizung oder durch Umspülen der Kavität (2) mit einem Gas oder einer Flüssigkeit durchgeführt wird.
- 5
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei das Abkühlen durch Umspülen der Kavität mit einem Gas oder einer Flüssigkeit oder mittels eines Peltierelements durchgeführt wird.
- 10
14. Vorrichtung zum Nachweis einer in einer Probe ggf. enthaltenen Nukleotidsequenz mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit einem Träger (1) mit mindestens einer Kavität (2), einem zur Kavität (2) komplementär ausgebildeten Deckel (3), der so auf den Träger (1) aufsetzbar ist, daß eine in der Kavität (2) aufgenommene Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität (2) und dem Deckel (3) gebildeten Spalt (S) verdrängbar ist und einer in der Nähe einer Öffnung der Kavität (2) angeordneten Dichtung (5, 12) zum Abdichten des Spalts (S), **dadurch gekennzeichnet**, dass die Kavität eine konisch zur Öffnung sich erweiternde umlaufende Seitenwand (SW) und der Spalt (S) eine Breite (B) von höchstens 1mm aufweist.
- 15
- 20
- 25
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, wobei eine Einrichtung zum zyklischen Aufheizen und Abkühlen der Nachweislösung vorgesehen ist.
- 30
16. Vorrichtung nach Anspruch 14 oder 15, wobei eine Einrichtung zum Untersuchen der Fluoreszenzeigenschaften der Nachweislösung und/oder einer der Primer vorgesehen ist.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei der Träger aus einem lichtdurchlässigen Material, vorzugsweise aus Glas oder Kunststoff, hergestellt ist.
- 5 18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 17, wobei die Kavität (2) abschnittsweise planar ausgebildet ist, vorzugsweise einen ebenen Boden (B), aufweist.
- 10 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei auf dem Träger (1) und/oder an der Innenseite (I) des Deckels (3) in zwischen den Kavitäten (2) bzw. an der Innenseite (I) des Deckels (3) vorgesehenen Vorsprüngen (4) befindlichen Abschnitten eine weitere Dichtung (12) vorgesehen ist.
- 15 20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, wobei der Träger 96 Kavitäten (2) und der Deckel (3) 96 zur Form der Kavitäten (2) komplementäre Vorsprünge (4) aufweisen.
- 20 21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 20, wobei der Deckel (3) aus einem elektrisch leitfähigen Material, vorzugsweise einem Kunststoff, hergestellt ist.
- 25 22. Vorrichtung nach Anspruch 21, wobei der Kunststoff ein Polycarbonat, Trimethylthiophen, Triaminobenzol und/oder ein Polycarben enthält und die Innenseite (I) des Deckels (3) zumindest abschnittsweise mit einer biomolekülbindenden Substanz versehen ist.
- 30 23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 22, wobei der Träger (1) eine, vorzugsweise aus Platin hergestellte, Elektrode aufweist, so daß ein elektrisches Feld angelegt werden kann, durch das in der Nachweislösung enthaltene

Nukleotidsequenz auf die Innenseite (I) bewegt und durch Feldinversionszyklen angereichert werden können.

24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 23, wobei der
5 Nachweislösung ein erster Primer zugesetzt ist.
25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 24, wobei der Nachweislösung ein zweiter Primer zugesetzt ist.
- 10 26. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 14 bis 25, wobei an der der Kavität (2) zugewandten Innenseite (I) des Deckels (3) ein dritter Primer, vorzugsweise mit seinem 5'-terminalen Ende, gebunden ist.
- 15 27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 26, wobei ein zum Anregen von Fluoreszenz zwischen Boden (B) und der Innenseite (I) des Deckels (3) dienendes Mittel vorgesehen ist.
- 20 28. Vorrichtung nach Anspruch 27, wobei vom Mittel zum Anregen stammende Strahlung auf die Innenseite (I) des Deckels (3) fokussierbar ist.
- 25 29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 oder 28, wobei das Mittel (7) zum Anregen von Fluoreszenz von einer Laserdiode erzeugt wird.
- 30 30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 29, wobei eine Einrichtung (8) zur Detektion der Fluoreszenz vorgesehen ist.

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 30, wobei eine Einrichtung zur Auswertung der beobachteten Fluoreszenz vorgesehen ist.
- 5 32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 29, wobei eine Einrichtung zum Bewegen des Trägers (1) relativ zum Mittel (7) zum Anregen von Fluoreszenz und/oder zur Einrichtung (8) zur Detektion vorgesehen ist.
- 10 33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 32, wobei ein facettenaugenartiges Mittel zur separaten Anregung und/oder Detektion der Fluoreszenz zwischen jedem Boden (B) und der Innenseite (I) des dazugehörigen Deckels (3) vorgesehen ist.
- 15 34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 33, wobei der Deckel (3) und/oder der Träger (1) zumindest abschnittsweise schwarz gefärbt ist, so daß darauf abgestrahlte Wärme wirkungsvoll absorbiert wird.
- 20 35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 34, wobei eine Einrichtung zum zyklischen Aufheizen und Abkühlen der Nachweislösung vorgesehen ist.
- 25 36. Vorrichtung nach Anspruch 35, wobei zum Beheizen ein Mittel (9) zur Erzeugung von Licht, vorzugsweise Infrarotstrahlung, eine Widerstandsheizung oder ein Mittel zum Umspülen der Kavität (2) mit einem Gas oder einer Flüssigkeit vorgesehen ist.
- 30 37. Vorrichtung nach Anspruch 35 oder 36, wobei ein Mittel (10) zum Abkühlen, vorzugsweise durch Umspülen der Kavi-

tät (2) mit einem Gas oder einer Flüssigkeit oder mittels eines Peltierelements, vorgesehen ist.

5 38. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 37, wobei der Träger (1) einen aus Glas hergestellten Boden (B) aufweist.

10 39. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 37, wobei die Dichtung (5) durch eine an der Seitenwand (SW) umlaufende Ausnehmung (14) und einen dazu komplementären am Vorsprung (4) vorgesehenen umlaufenden formschlüssig in die Ausnehmung (14) einrastbaren Wulst (13) gebildet ist.

15 40. Vorrichtung nach Anspruch 40, wobei die Dichtung (5) bei einem Druckanstieg in der Kavität (2) selbstabdichtend ist, indem der Wulst (13) gegen die Ausnehmung (14) gedrückt wird.

20 41. Kit zur Durchführung der Verfahrens nach Anspruch 1 mit

a) einem Träger (1) mit mindestens einer Kavität (2) und

25 b) einem zur Kavität (2) komplementär ausgebildeten Deckel (3), der so auf den Träger (1) aufsetzbar ist, daß eine in der Kavität (2) aufgenommene Nachweislösung zumindest teilweise in einen zwischen der Kavität (2) und dem Deckel (3) gebildeten Spalt (S) verdrängbar ist,

30 c) eine mindestens einen ersten Primer enthaltende Nachweislösung.

42. Kit nach Anspruch 41, wobei die Nachweislösung einen zweiten Primer enthält.

43. Kit nach Anspruch 41 oder 42, wobei ein dritter Primer, vorzugsweise mit seinem 5'-terminalen Ende, an eine der Kavität (2) zugewandte Innenseite (I) des Deckels (3) gebunden ist.
- 5

1/5

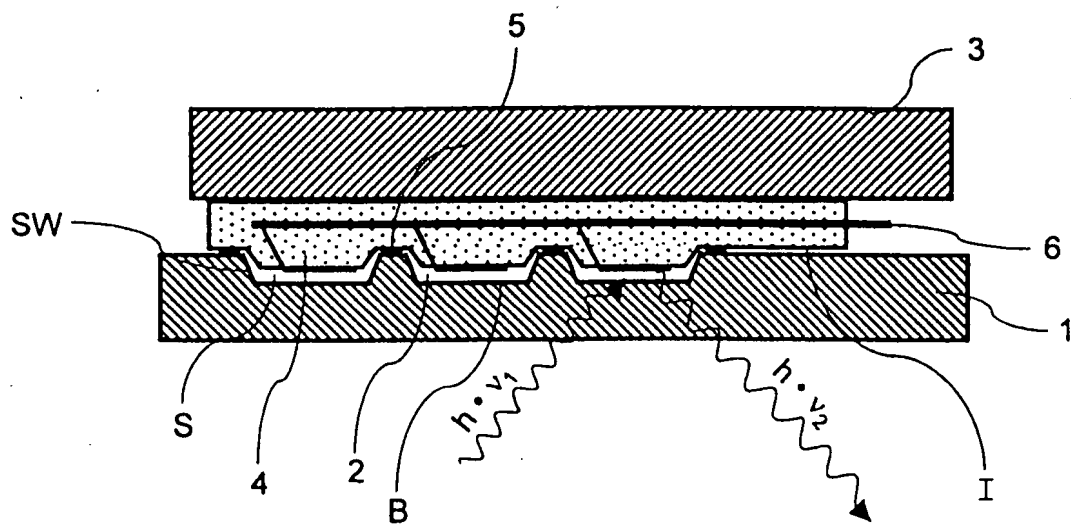


Fig. 1

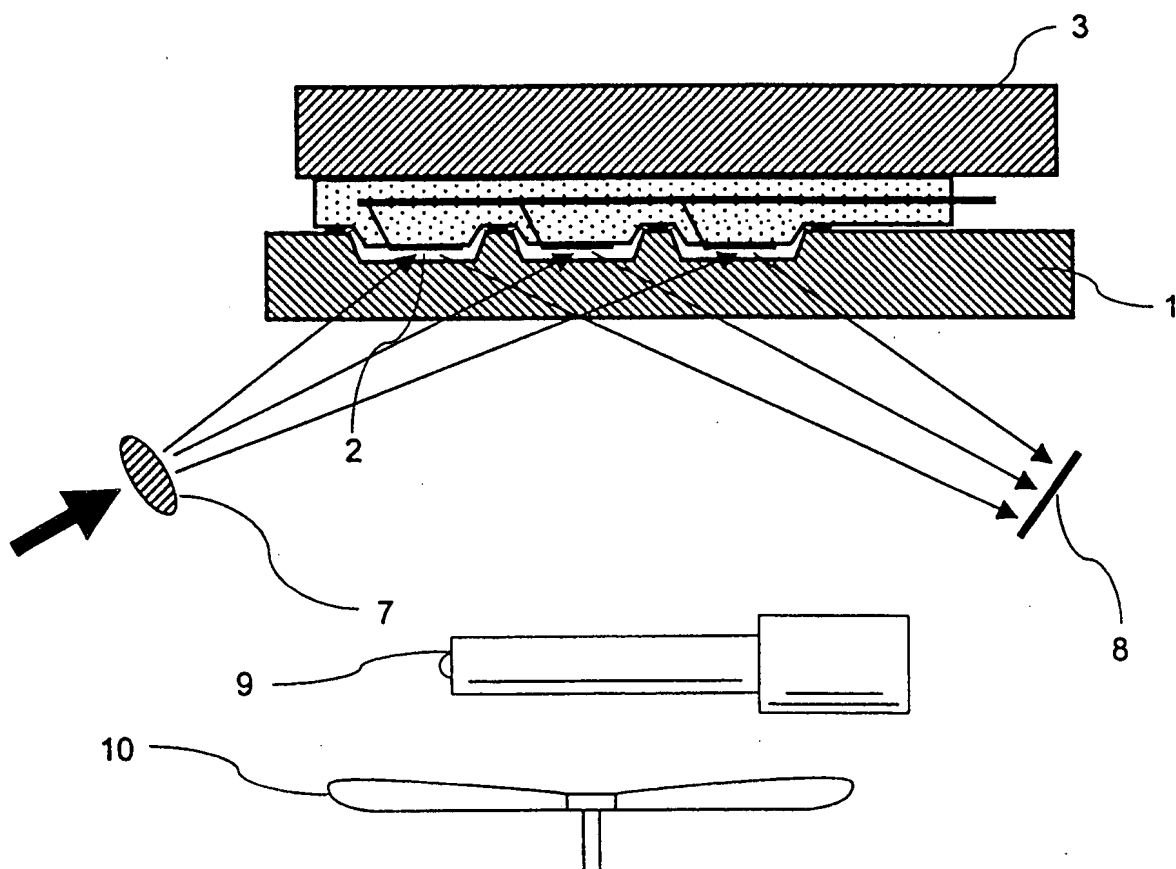


Fig. 2

2/5

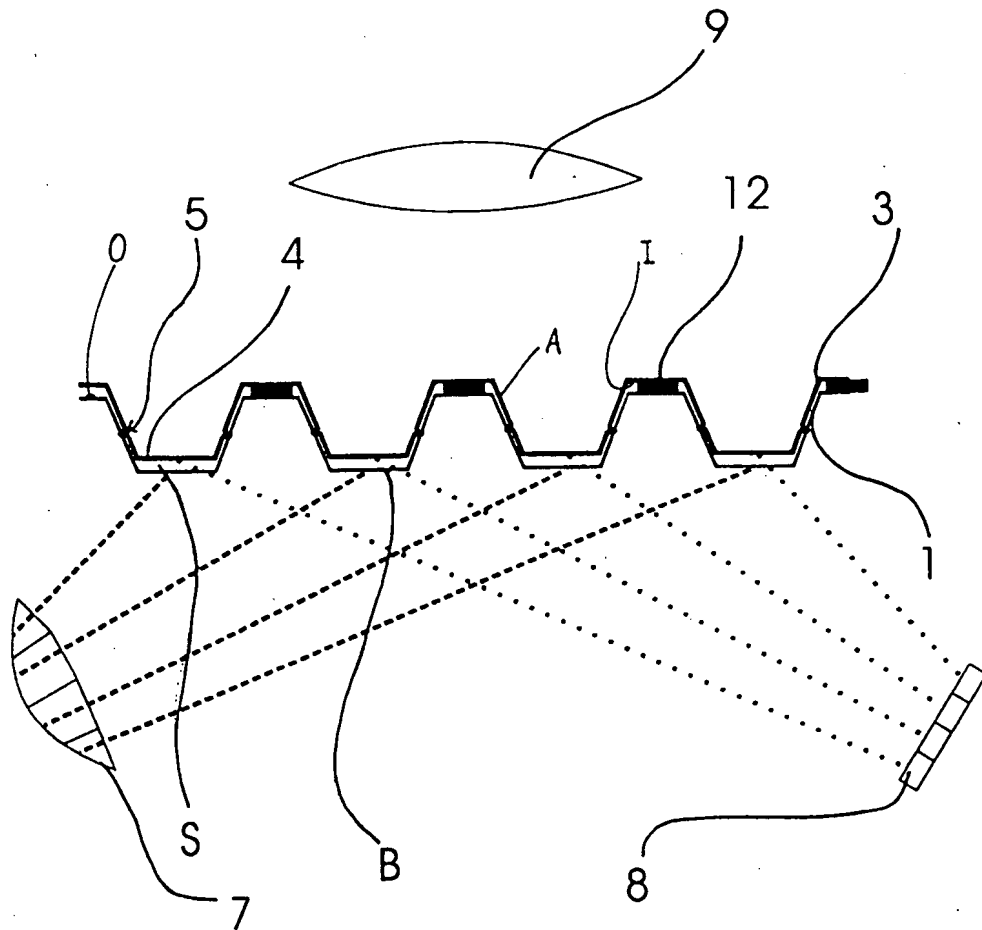


Fig. 3

3/5

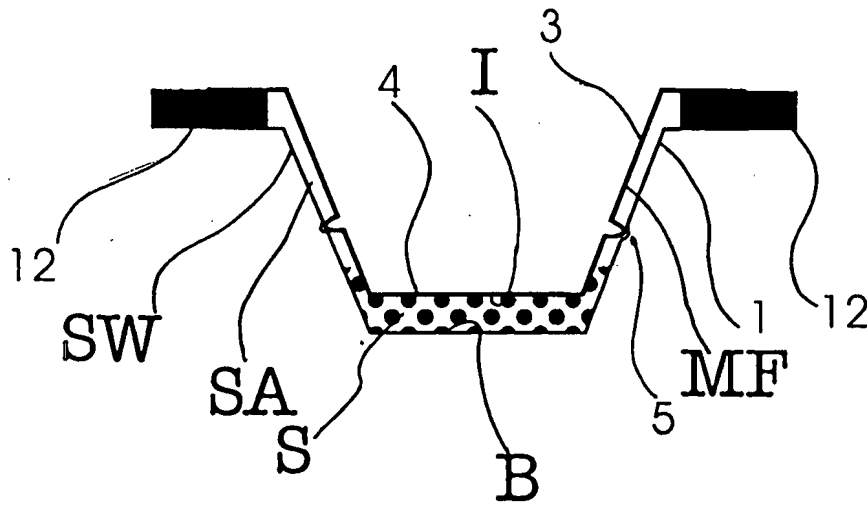


Fig. 3a

4/5

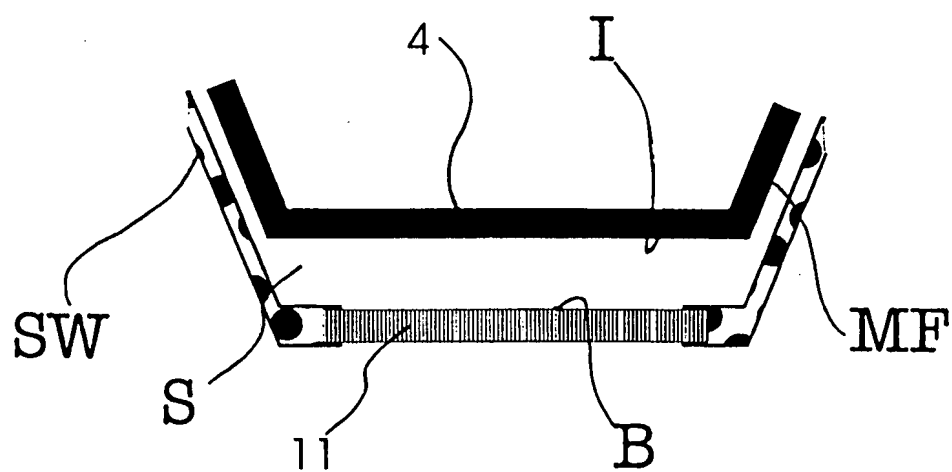


Fig. 4

5/5

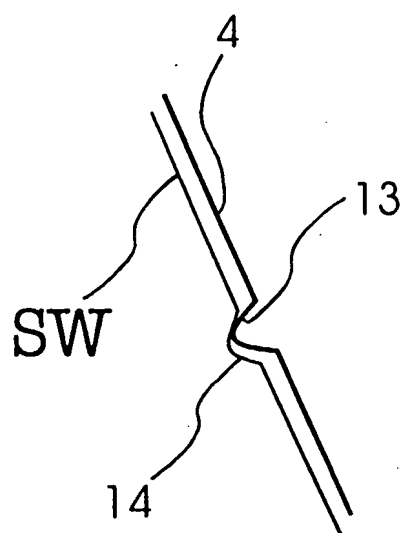


Fig. 5

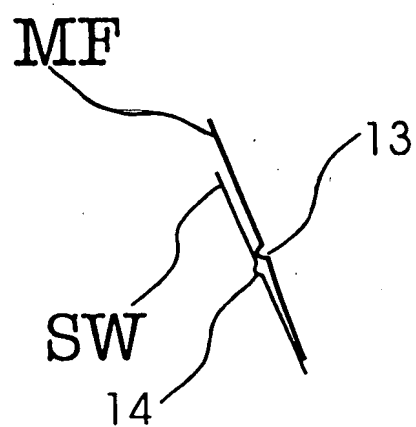


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/DE 99/01589

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B01L3/00 B01L7/00 //C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01L B10L C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X.	WO 96 02836 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;MOTTE BENGT (SE)) 1 February 1996 (1996-02-01) & US 5 882 595 A (LA MOTTE BENGT) 16 March 1999 (1999-03-16)	1-3, 11, 41, 42
A	column 1, line 58 -column 2, line 18 column 2, line 45 -column 2, line 57 column 2, line 61 -column 4, line 28 column 4, line 43 -column 4, line 58 column 5, line 16 -column 5, line 29 figures 1-12 --- -/--	4, 5



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 1999

Date of mailing of the international search report

05/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/01589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	<p>GB 2 333 250 A (SECR DEFENCE) 21 July 1999 (1999-07-21)</p> <p>page 3, line 10 -page 3, line 28 page 4, line 12 -page 4, line 28 page 5, line 1 -page 5, line 6 page 6, line 16 -page 6, line 25 page 8, line 1 -page 8, line 8 page 8, line 30 -page 9, line 19 page 10, line 25 -page 11, line 6 page 12, line 8 -page 13, line 5 page 13, line 19 -page 14, line 10 claim 5; figures 1,4</p>	<p>1-3, 8-18, 20, 21, 24, 25, 27, 30, 31, 35-37, 41, 42</p>
A	<p>FR 2 672 301 A (EIBET ;LARZUL DANIEL (FR)) 7 August 1992 (1992-08-07) abstract page 2, line 12 -page 2, line 15 page 4, line 7 -page 4, line 9 page 11, line 25 -page 11, line 34 page 12, line 8 -page 12, line 27 page 13, line 1 -page 13, line 7 page 19, line 14 -page 19, line 19 page 20, line 11 -page 21, line 5 page 22, line 11 -page 22, line 15 figures 1-4</p>	<p>1-3, 11, 15</p>
P, A	<p>WO 98 25701 A (UNIV CALIFORNIA) 18 June 1998 (1998-06-18) page 9, line 20 -page 9, line 23 page 10, line 26 -page 10, line 29 page 12, paragraph 4 -page 13, line 20 page 15, line 31 -page 15, line 34 page 20, paragraph 4 page 21, paragraph 4 -page 22, paragraph 3 page 23, paragraph 5 -page 24, paragraph 1 figures 3, 4, 9, 10</p>	<p>4, 7, 16-18</p>
A	<p>US 5 585 242 A (BOUMA STANLEY R ET AL) 17 December 1996 (1996-12-17) page 3, line 26 -page 4, line 29 figures 1, 2</p>	<p>1-4, 8-11, 14, 15, 17, 41</p>
A	<p>US 5 556 773 A (YOURNO JOSEPH) 17 September 1996 (1996-09-17) column 3, line 58 -column 5, line 4 figure 1</p>	<p>1-5, 14, 26, 41-43</p>
6 A	<p>US 5 484 734 A (KIMURA SHIRO) 16 January 1996 (1996-01-16)</p>	<p>19</p>
1	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/01589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 5 604 130 A (WARNER BRIAN D ET AL) 18 February 1997 (1997-02-18) abstract; figures 1-3 -----</p>	1, 14, 41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/01589

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9602836	A	01-02-1996	EP 0772775 A JP 10503366 T US 5882595 A	14-05-1997 31-03-1998 16-03-1999
GB 2333250	A	21-07-1999	NONE	
FR 2672301	A	07-08-1992	NONE	
WO 9825701	A	18-06-1998	AU 5799198 A EP 0948408 A	03-07-1998 13-10-1999
US 5585242	A	17-12-1996	AU 4047893 A CA 2133643 A EP 0717779 A JP 7505297 T WO 9320240 A	08-11-1993 14-10-1993 26-06-1996 15-06-1995 14-10-1993
US 5556773	A	17-09-1996	NONE	
US 5484734	A	16-01-1996	JP 2053764 C JP 6254386 A JP 7079963 B	23-05-1996 13-09-1994 30-08-1995
US 5604130	A	18-02-1997	AU 5882696 A EP 0828560 A JP 11507508 T WO 9639481 A	24-12-1996 18-03-1998 06-07-1999 12-12-1996

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 B01L3/00 B01L7/00 //C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 6 B01L B10L C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 02836 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;MOTTE BENGT (SE)) 1. Februar 1996 (1996-02-01) & US 5 882 595 A (LA MOTTE BENGT) 16. März 1999 (1999-03-16) Spalte 1, Zeile 58 -Spalte 2, Zeile 18 Spalte 2, Zeile 45 -Spalte 2, Zeile 57 Spalte 2, Zeile 61 -Spalte 4, Zeile 28 Spalte 4, Zeile 43 -Spalte 4, Zeile 58 Spalte 5, Zeile 16 -Spalte 5, Zeile 29 Abbildungen 1-12 ---	1-3, 11, 41, 42 4, 5
A	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Oktober 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05/11/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
E	<p>GB 2 333 250 A (SECR DEFENCE) 21. Juli 1999 (1999-07-21)</p> <p>Seite 3, Zeile 10 -Seite 3, Zeile 28 Seite 4, Zeile 12 -Seite 4, Zeile 28 Seite 5, Zeile 1 -Seite 5, Zeile 6 Seite 6, Zeile 16 -Seite 6, Zeile 25 Seite 8, Zeile 1 -Seite 8, Zeile 8 Seite 8, Zeile 30 -Seite 9, Zeile 19 Seite 10, Zeile 25 -Seite 11, Zeile 6 Seite 12, Zeile 8 -Seite 13, Zeile 5 Seite 13, Zeile 19 -Seite 14, Zeile 10 Anspruch 5; Abbildungen 1,4</p>	<p>1-3, 8-18,20, 21,24, 25,27, 30,31, 35-37, 41,42</p>
A	<p>FR 2 672 301 A (EIBET ;LARZUL DANIEL (FR)) 7. August 1992 (1992-08-07) Zusammenfassung Seite 2, Zeile 12 -Seite 2, Zeile 15 Seite 4, Zeile 7 -Seite 4, Zeile 9 Seite 11, Zeile 25 -Seite 11, Zeile 34 Seite 12, Zeile 8 -Seite 12, Zeile 27 Seite 13, Zeile 1 -Seite 13, Zeile 7 Seite 19, Zeile 14 -Seite 19, Zeile 19 Seite 20, Zeile 11 -Seite 21, Zeile 5 Seite 22, Zeile 11 -Seite 22, Zeile 15 Abbildungen 1-4</p>	<p>1-3,11, 15</p>
P,A	<p>WO 98 25701 A (UNIV CALIFORNIA) 18. Juni 1998 (1998-06-18) Seite 9, Zeile 20 -Seite 9, Zeile 23 Seite 10, Zeile 26 -Seite 10, Zeile 29 Seite 12, Absatz 4 -Seite 13, Zeile 20 Seite 15, Zeile 31 -Seite 15, Zeile 34 Seite 20, Absatz 4 Seite 21, Absatz 4 -Seite 22, Absatz 3 Seite 23, Absatz 5 -Seite 24, Absatz 1 Abbildungen 3,4,9,10</p>	<p>4,7, 16-18</p>
A	<p>US 5 585 242 A (BOUMA STANLEY R ET AL) 17. Dezember 1996 (1996-12-17)</p> <p>Seite 3, Zeile 26 -Seite 4, Zeile 29 Abbildungen 1,2</p>	<p>1-4, 8-11,14, 15,17,41</p>
A	<p>US 5 556 773 A (YOURNO JOSEPH) 17. September 1996 (1996-09-17) Spalte 3, Zeile 58 -Spalte 5, Zeile 4 Abbildung 1</p>	<p>1-5,14, 26,41-43</p>
6 A	<p>US 5 484 734 A (KIMURA SHIRO) 16. Januar 1996 (1996-01-16)</p>	<p>19</p>
1	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 604 130 A (WARNER BRIAN D ET AL) 18. Februar 1997 (1997-02-18) Zusammenfassung; Abbildungen 1-3 -----	1,14,41

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01589

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9602836	A	01-02-1996	EP	0772775 A	14-05-1997
			JP	10503366 T	31-03-1998
			US	5882595 A	16-03-1999

GB 2333250	A	21-07-1999	KEINE		

FR 2672301	A	07-08-1992	KEINE		

WO 9825701	A	18-06-1998	AU	5799198 A	03-07-1998
			EP	0948408 A	13-10-1999

US 5585242	A	17-12-1996	AU	4047893 A	08-11-1993
			CA	2133643 A	14-10-1993
			EP	0717779 A	26-06-1996
			JP	7505297 T	15-06-1995
			WO	9320240 A	14-10-1993

US 5556773	A	17-09-1996	KEINE		

US 5484734	A	16-01-1996	JP	2053764 C	23-05-1996
			JP	6254386 A	13-09-1994
			JP	7079963 B	30-08-1995

US 5604130	A	18-02-1997	AU	5882696 A	24-12-1996
			EP	0828560 A	18-03-1998
			JP	11507508 T	06-07-1999
			WO	9639481 A	12-12-1996

IDS REFERENCES



☐ FOR